

佐賀大農彙 (Bull. Fac. Agr., Saga Univ.) 85 : 147~154 (2000)

## アグロバクテリウムを介した形質転換トマト作出法の改良

帆士美聡子・樋田 咲子・高木 胖・穴井 豊昭  
(育種学研究室)

平成12年 9月12日 受理

### Improvement of *Agrobacterium*-mediated Transformation Method on Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Misako HOSHI, Sakiko HIDA, Yutaka TAKAGI and Toyoaki ANAI  
(Laboratory of Plant Breeding)

Received September 12, 2000

#### Summary

*Agrobacterium*-mediated transformation system is one of the simplest and highest-efficiency methods to introduce the foreign genes into higher plant species. However, in tomato plants, it is still ineffective to obtain the transgenic plants by this method. In this study, we compared several antibiotics to eliminate *Agrobacterium* growth after infection step. The results of our study indicate that augustin that consists of ticarcillin and potassium clavulanate is an excellent choice to apply in tomato transformation. In addition, we determined promoter activity of maize ubiquitin gene in a transgenic tomato plant by northern-blot analysis. The ubiquitin promoter also works well in all tissue that we tested. The activity of this promoter is in between nopal synthase promoter and cauliflower mosaic virus 35S promoter.

**Key word :** *Agrobacterium*, transgenic tomato, antibiotic, maize ubiquitin promoter

#### 緒 言

近年の植物細胞に対する外来遺伝子導入技術の進歩に伴い、異種の遺伝子を利用した植物の品種改良が可能となった。この際、外来遺伝子の導入に用いられる方法には、植物病原菌であるアグロバクテリウムを利用する方法<sup>1), 2)</sup>を始めとして、DNAを直接細胞に導入するポリエチレングリコール法<sup>3)</sup>、エレクトロポレーション法<sup>4), 5)</sup>、マイクロインジェクション法<sup>6)</sup>、ボンバードメント法<sup>7)</sup>といった方法が知られている。このうちアグロバクテリウムを用いた方法は、植物に対する最初の外来遺伝子導入法として報告されて以来、様々な植物に対して応用され、最近ではイネ<sup>8)</sup>やトウモロコシ<sup>9)</sup>といった単子葉植物への適用も可能となっている。しかしながら、トマトを用いた形質転換は比較的早い時期に報告がなされたにも拘らず<sup>10)</sup>、現在も他の植物に比べて形質転換効率が低いことが知られており、この原因の一つとして、形質転換細胞の選抜およびアグロバクテリウムの除菌の際に使用する抗生物質がトマトの再分化を妨げている可能性が指摘されていた<sup>11)</sup>。

そこで我々は、本研究において選抜及び除菌の際に用いる抗生物質の形質転換効率に対する

影響を検討し、効率の良い形質転換条件を確立することを試みた。更に、得られた形質転換体への外来遺伝子の導入様式及び発現パターンについての解析を行った。また、ハイグロマイシン耐性遺伝子及び $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子が付与する形質を指標として、導入遺伝子の遺伝的安定性についての調査も行ったので合わせて報告する。

## 材料及び方法

### 《アグロバクテリウム》

形質転換には、図1に示したバイナリーベクターを保持する *Agrobacterium tumefaciens* EHA101株<sup>12)</sup>を用いた。

### 《トマトの形質転換》

トマト [*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Money Maker] 種子を70%エタノールに2分間浸漬し、脱イオン水ですすいだ後、Tween20を1滴加えた1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液(200ml)中で攪拌しながら45分間滅菌した。この種子を滅菌水により4回すすぎ、滅菌水中にて一晩振とうすることで完全に次亜塩素酸ナトリウムを除去した。滅菌した種子は、種子発芽培地[MS<sup>13)</sup>培地, 0.8%寒天, 1%D-グルコース, pH5.8]上に移し、25℃, 16時間明期/8時間暗期の条件で発芽させた。播種後7日目の芽生えから子葉を切り取り、外植片培養培地[MS培地,

3%ショ糖, 0.5mg/l 2, 4-D, 10mg/l アセトシリンゴン, pH5.5]に外植片の表面を上にして置床し、25℃, 暗黒下で8時間のプレインキュベーションを行った。pBI101-Hm-AT1-GUS(図1)を保持する *Agrobacterium tumefaciens* EHA101株を50mg/l カナマイシン及び50mg/l ハイグロマイシンBを含むYEP培地中で一晩培養後、OD600 $\approx$ 0.5となるようにアグロバクテリウム懸濁培地[MS培地, 3%ショ糖, 10mg/l アセトシリンゴン, pH5.8]に懸濁した。この菌液中に外植片を浸して30秒間の超音波処理を行った後、外植片を前述の培地上で約40時間共存培養した。その後、除菌用抗生物質(500mg/l カルベニシリン, 500mg/l クラフォランもしくは150mg/l のオーグペニンのいずれか)を含む滅菌水中にて4回すすいだ後、選抜用培地[MS培地, 2%ショ糖, 2mg/l *trans*-zeatin, 選抜用抗生物質(25mg/l ハイグロマイシンBもしくは50mg/l カナマイシンのいずれか), 除菌用抗生物質(500mg/l カルベニシリン, 500mg/l クラフォランもしくは150mg/l オーグペニンのいずれか), pH6.0]に移して培養を行った。再生してきた不定芽は根形成培地[1/2 MS培地, 0.5%ショ糖, 0.5mg/l IBA, pH6.0]に移して発根させた後に馴化を行い、ポットで育成した。

### 《プローブの作成》

DNA プローブの作成は、前述の方法<sup>14)</sup>に従って行った。

NPT II, GUS および HPH の3種類の遺伝子について、アンチセンス RNA プローブを作成した。NPT II プローブは、pHTS-35S-GUSを鋳型としてKAN-1プライマー[5'-gcgatagaaggcgatgcg-3']およびKAN-2プライマー[5'-ccggctacctgcccattcg-3']により増幅したNPT II 遺伝子の一部(400bp)をpBluescript II SK<sup>+</sup>のEcoRVの部位に導入したプラスミドをHindIIIで直鎖状に切断し、Thermo T7 RNA ポリメラーゼ(TOYOBO)及びDIG-RNA Labeling Mix(BOEHRINGER MANNHEIM)を用いて標識プローブを合成した。GUS プローブは、pBI221からBamHIとSacIを用いてGUS 遺伝子断片(1.8kbp)を切り出し、BamHI及びSacIで切断したpBluescript II KS<sup>-</sup>に導入したものをEcoRVで切断し、HPH プローブは、pCHからBamHIを用いてHPH 遺伝子断片を切り出し、pBluescript II KS<sup>-</sup>のBamHI部位に導入した

後、*EcoR* I で切断したものを鋳型として標識反応を行った。

### 《サザンブロット解析》

改変 CTAB 法<sup>14)</sup>に従って調製したのトマトゲノミック DNA 10 $\mu$ g を *EcoR* I を用いて消化し、サザンブロット解析に用いた。

この際のハイブリダイゼーション及び洗浄については、前述の方法と同様の条件で行った<sup>14)</sup>。ただし、発光基質としては CDP-Star を使用した。

### 《total RNA の調製》

total RNA の抽出は、フェノール/SDS 法<sup>15)</sup>を基本として、若干の改変を加えて行った。

5 g のトマト組織（緑葉，茎，根，未熟な果実及び成熟した果実）を液体窒素中で凍結し、乳鉢で粉碎した後、25ml の抽出バッファー [0.8M Tris-HCl, 90mM LiCl, 4.5mM EDTA, 1 % SDS, pH8.2]，及び10ml の水飽和フェノールを加え、ポリトロン型ホモジナイザーを用いて最高速で1分間攪拌した。更に10ml のクロロホルムを加えてよく攪拌し、2500rpm で10分間遠心分離した。この水層を新たなチューブに移し、5 ml の2 M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH4.0)，水飽和フェノール及びクロロホルムをそれぞれ10ml 加えてよく攪拌した後、同様に遠心分離を行った。更に、フェノール-クロロホルム抽出を4回繰り返すことでタンパク質を完全に除去した。その後、水層に10ml のクロロホルムを加えてフェノールを除去し、1/10量の3 M 酢酸ナトリウム水溶液及び1.5倍量のイソプロパノールを加えて RNA を沈殿させた。沈殿を滅菌水に溶かした後、最終濃度が2.0~2.5M になるように塩化リチウム水溶液を加えて、4℃にて一晩静置することで RNA のリチウム塩を形成させた。これを遠心分離により回収し、最終的に500 $\mu$ l の滅菌水に溶解した。

### 《ノーザンブロット解析》

10 $\mu$ g の total RNA を1.2%のホルムアルデヒド・アガロースゲル電気泳動を用いて分離し、20 $\times$ SSC バッファーを用いて、ナイロンメンブレン (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham) に転写した。

メンブレンを4 $\times$ SSCですすいだ後、80℃にて一時間乾熱処理することで RNA を固定化した。メンブレンは、高 SDS ハイブリダイゼーションバッファー [50%ホルムアミド, 50mM リン酸ナトリウムバッファー, 2%ブロッキング試薬, 5 $\times$ SSC, 0.1%*N*-ラウロイルサルコシン, 7%SDS, pH7.0] 中で、65℃にて5時間以上プレハイブリダイゼーションを行った。

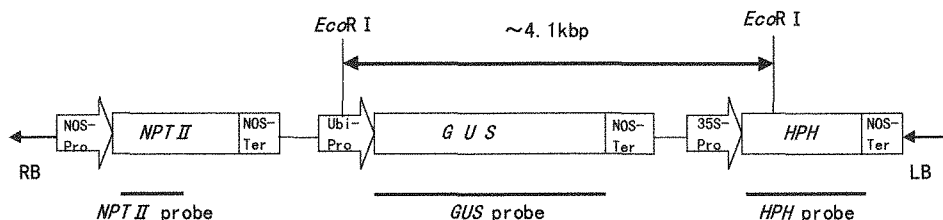


図1 本研究で用いたバイナリーベクターにおける T-DNA 領域の遺伝子配置図

- |                           |  |
|---------------------------|--|
| GUS: $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子 | RB: ライトボーダー                              |
| NPT II: カナマイシン耐性遺伝子       | NOS-Pro: ノバリン合成酵素遺伝子プロモーター               |
| HPH: ハイグロマイシン耐性異遺伝子       | Ubi-Pro: トウモロコシユビキチン遺伝子プロモーター            |
| LB: レフトボーダー               | 35S-Pro: カリフラワーモザイクウイルス35S RNA 遺伝子プロモーター |
|                           | NOS-Ter: ノバリン合成酵素遺伝子ターミネーター              |

後, DIG 標識した RNA プローブを加えて, 更に65℃にて一晚ハイブリダイゼーションを行った. その後はサザンブロット解析と同様の手順で検出を行った.

### 《組織化学的解析》

解析に使用する組織試料は, 固定操作を行わず, GUS 染色液 [1.9mM X-Gluc, 0.5mM フェロシアン化カリウム, 0.5mM フェリシアン化カリウム, 0.3% Triton X-100, 20% メタノール, 100mM リン酸カリウムバッファー, pH7.0] に浸漬し, 37℃で一晚インキュベートして発色させた<sup>16)</sup>. 十分な発色が認められた後, 70%エタノール水溶液中に移してインキュベートし, クロロフィルを除いて観察を行った.

## 結果と考察

トマトの外植片に対して同一条件下でアグロバクテリウムの感染・共存培養を行った後, 異なる3種類の抗生物質を用いて除菌を行い, これらの再分化率を比較した. その結果, クラフォランを用いた場合は100切片から全く再分化個体が得られなかったのに対し, カルベニシリンを用いた場合で2個体, オーグペニンを用いた場合には8個体の再分化個体が得られた (表1). またデータは示さないが, クラフォランを用いて除菌を行った場合には再分化のみでなくカルスの増殖の著しい阻害も認められたことから, トマトにとって本薬剤の処理は極めて影響が大きい事が明らかになった. この理由としては, セファロスポリン系の抗生物質であるクラフォランがト

表1 除菌用抗生物質がトマト形質転換効率に与える影響

抗生物質	処理数	再分化数	再分化率 (%)
クラフォラン	100	0	0
カルベニシリン	100	2	2
オーグペニン	100	8	8

マト内生の酵素によって分解され, 植物の内生オーキシンであるインドール酢酸に類似した化合物を生じることで, この化合物がトマトの生育に悪影響を与えている可能性が考えられる. これに対して, トマトに影響が少なかったカルベニシリン及びオーグペニン (有効成分はチカルシリン) はいずれもペニシリン系の抗生物質であり, クラフォランとは異なる環構造を持っているので, インドール環類似の化合物は生じないものと考えられた. また, オーグペニンは有効成分としてチカルシリンとともに  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤であるクラブラン酸カリウムも含有しており, 抗生物質自体の安定性が増加していることから, カルベニシリンと比較すると低濃度の処理でも十分な除菌効果が認められ, 植物細胞に対する毒性をより低く押さえる事が可能であった. 以上の結果から, トマトの形質転換の際に使用する除菌用抗生物質としては, トマトに対する悪影響が少ないオーグペニンを使用することが好ましいと考えられた.

外来遺伝子の組み込み様式を明らかにするために, 最終的に馴化に成功した6個体の植物よりゲノミック DNA を抽出し, 制限酵素 *EcoR* I を用いて消化した後, *HPH* 遺伝子をプローブとしてサザンブロット解析を行った (図2). コントロール植物においてバンドは検出されなかったが, トランスジェニック植物においては, 1本から4本のバンドが検出された. 図1に示す様に, 約4.1kbpのバンドは, ユビキチンプロモーター内及び *HPH* 遺伝子内の *EcoR* I 部位の切断によって生じた全ての系統に共通するバンドと考えられ, *HPH* 遺伝子の一部及びLBに隣接するトマトゲノムの一部を含む断片はT-DNAの導入部位によりその長さが異なると予想される. その結果, 系統2, 4, 5及び6では1コピー, 系統1では2コピー, 系統3では3コピー以上の外来遺伝子の組み込みが起こったことが明らかとなった. (系統5及び6の形

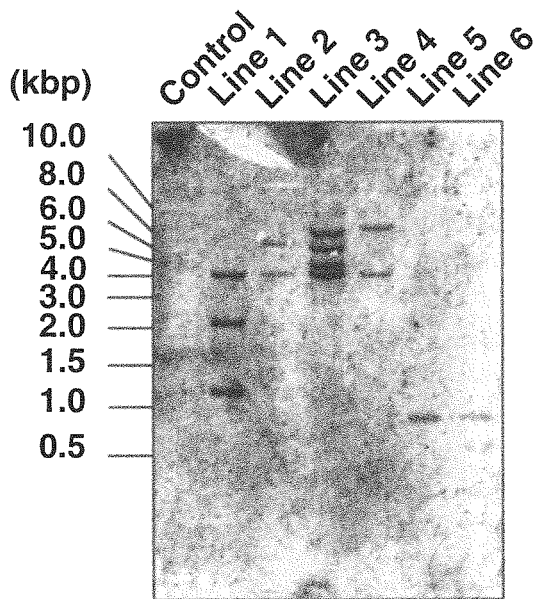


図2 外来遺伝子のトマトゲノム内への組み込み形態

付近に非常に弱いシグナルが検出された（データは示さず）。これらの遺伝子は、それぞれ異なるプロモーターにより制御されており、ノーザンブロットでのシグナル強度は、プロモーター活性を反映したものであると考えられることから、トマト植物体でのプロモーター活性は、35S プロモーター<sup>17)</sup>、ユビキチンプロモーター<sup>18)</sup>、NOS プロモーター<sup>19)</sup>の順に高いことが明らかになった。今回、*HPH* 遺伝子の発現に用いた35S プロモーターはカリフラワーモザイクウイルス由来で、双子葉植物において非常に強い活性を持つプロモーターであることが知られており、*NPT II* 遺伝子の発現に用いたNOS プロモーターと比較すると、約30~60%ほど高い活性を示すと報告されていた<sup>20), 21)</sup>。しかしながら、本実験の結果は、これまでの報告とは異なり、これら2つのプロモーター活性の差が予想されていた以上に大きいという事を示している。これに対して、本来、単子葉植物での遺伝子発現用に開発されたトウモロコシ由来のユビキチンプロモーターは、トマトにおいて、35S プロモーターほどの活性は示さないものの、意外にもNOS プロモーターより高い活性を示すことが明らかになった。この結果は、これまで単子葉植物専用と考えられていたユビキチンプロモーターの用途に新たな可能性を示唆するものである。

続いて、後代における導入遺伝子の遺伝的安定性を調べるた

質転換は、プロモーター部分が欠失したベクターを用いて行ったため、約4.1 kbp のバンドは出現せず、その代わりに約1 kbp 付近に共通に出現するバンドが認められる。）

次に、導入した3種類の遺伝子のプロモーターについて、トマト植物体におけるプロモーター活性の違いを比較する目的で、これらの個体から total RNA を抽出し、3種類の遺伝子に対応するプローブを用いてノーザンブロット解析を行った。形質転換を行っていないコントロール植物ではバンドが確認されなかったのに対して、*GUS* プローブを用いた場合は約1.8kb (図3上)、*HPH* プローブでは約1.0kb (図3下；根では混入した多糖類のために若干移動度が異なっている)、*NPT II* プローブを用いた場合には、約800b

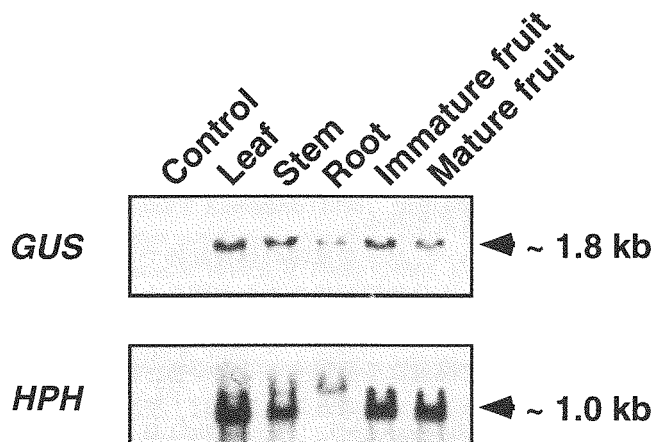


図3 外来遺伝子のトマト組織における発現パターン

表2 T<sub>1</sub>種子におけるマーカー遺伝子の遺伝的安定性

系統	個体数	ハイグロマイシンB 耐性		$\chi^2$	$p$	期待値(分離比)
		耐性	感受性			
1	46	42	4	0.197	$p > 0.5$	43 : 3 (15 : 1)
2	44	33	11	0	$p > 0.9$	33 : 11 (3 : 1)

めに、このうち2系統についてT<sub>1</sub>種子50粒を、25 $\mu$ g/mlのハイグロマイシンBを含む種子発芽培地上に播種し、薬剤耐性試験を行った。その結果、系統1ではハイグロマイシン耐性が42個体に対して感受性が4個体出現し、系統2では耐性が33個体に対して感受性が11個体出現した(表2)。この結果を、サザンブロット解析により予想される分離比に当てはめてみると、 $\chi^2$ 値はそれぞれ0.218及び0.031、確率はそれぞれ $p > 0.5$ 及び $p > 0.75$ となり、期待値によく適合する。更に、もう一つのマーカー遺伝子であるGUS遺伝子が発現すると、その酵素活性により基質であるX-Gucを青色のインジゴチン色素へと変化させる反応を利用して、組織化学的にGUS遺伝子産物の検出を行った。コントロール植物では全く青色の発色は認められなかったのに対して、GUS遺伝子が導入された植物体は全体が青色に染色された(図4)。これはGUS遺伝子の発現を制御しているユビキチンプロモーターの特性によるものであり、ノーザンブロット解析のデータとも矛盾しない結果となった。そこで、ハイグロマイシンに耐性を示した個体から子葉の一部を切り取り、GUS染色を行ったところ全ての子葉が青色に染色された(データは示さず)。その結果、ハイグロマイシン耐性とGUS活性は完全に同じ挙動を示すことが明らかとなった。

本研究の結果、オーグペニンを用いることで、トマトの生育を阻害せずにアグロバクテリウムの除菌を行うことが可能になった。また、アグロバクテリウム感染時のフィーダーセル培養も、アセトシリンゴンの使用により省略可能である事が明らかとなった。しかしながら今回の研究で得られた形質転換効率は、十分に満足できる値であるとは言い難い。実際に、アグロバクテリウムの感染・除菌を行い、選抜培地に移した直後に組織染色を行うと、かなり高い効率で感染が成立していることがわかる。にもかかわらず、実際には低い割合でしか形質転換体が得られないことから、再分化の際の培養条件や試供する品種等について、更なる検討を進めていく必要があると考えられる。

また、本研究において、単子葉植物の形質転換での有効性が示されているユビキチンプロモーターは、トマトにも十分利用可能なことが明らかとなった。本プロモーターは、強力な35Sプロモーターと比較すると、発現レベルでは多少劣るもののNOSプロモーターの数倍の活性を有し、様々な組織で満遍なく発現することから、35Sプロモーターが潜在的に有するいくつかの問題点を回避できると考えられる。例えば、35Sプロモーターを使用したトランスジェニック植物では、ウイルス感染により、導入遺伝子がサイレンシングを起こし、不活化するという報告がある<sup>22)</sup>。トランスジェニック植物の実用化に向けて、このような事態を予防するとい

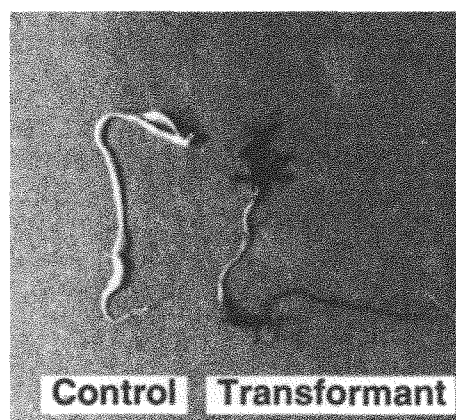


図4 トマト芽生えにおける $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子発現の組織化学的解析

た観点からも、本プロモーターの利用は非常に有効であると考えられる。

## 摘 要

アグロバクテリウムを用いた方法は、高等植物に対する外来遺伝子導入方法のうちで最も簡便かつ高効率な方法の1つである。しかしながら、トマトにおいては技術的な問題点が多く、本法を用いて効率的にトランスジェニック植物の作出が可能であるとは言いがたい。本研究では、アグロバクテリウム感染後の除菌に用いる数種の抗生物質について比較検討を行った結果、有効成分としてチカルシリンとクラブラン酸カリウムを含む複合抗生物質であるオーグペニンを用いることが効果的である事を示した。さらに、ノーザンブロット解析を用いてトウモロコシ由来のユビキチンプロモーターのトマト組織における活性を解析し、このプロモーターがどの組織においても効率良く発現することを明らかにした。また他のプロモーターとの比較から、本プロモーターがカリフラワーモザイクウイルス由来の35S RNA プロモーターとアグロバクテリウム由来のノパリン合成酵素遺伝子プロモーターの中間程度の活性を示すことも明らかにした。

## 引 用 文 献

1. Estrera, L. H., A. Depicker, M. V. Montagu and J. Schell (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* **303**, 209-213.
2. Hoekema, A., P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas and R. A. Schilperoort (1983). A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179-180.
3. Paszkowski, J., R. D. Shillito, M. Saul, V. Mandak, B. Hohn and I. Potrykus (1984). Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* **3**, 2717-2722.
4. Fromm, M., L. P. Taylor and V. Walbot (1985). Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5824-5828.
5. Fromm, M. E., L. P. Taylor and V. Walbot (1986). Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* **319**, 791-793.
6. Crossway, A., J. V. Oakes, J. M. Irvine, B. Ward, V. C. Knauf and C. K. Shewmaker (1986). Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 179-185.
7. Klein, T., E. C. Harper, Z. S. Vab, J. C. Sanford, M. E. Fromm and P. Maliga (1988). Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8502-8505.
8. Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **6**, 271-282.
9. Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari and T. Kumashiro (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Biotechnol.* **14**, 745-750.
10. McCormick, S., J. Niedermeyer, J. Fry, A. Barnason, R. Horsch, R. Fraley (1986). Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* **15**, 81-84.
11. Ling, H. J., D. Kriseleit and M. W. Ganal (1998). Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Rep.* **17**, 843-847.
12. Hood, E. E., G. L. Helmer, R. T. Fraley and M.-D. Chilton (1986). The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A 281 is encoded in a region of pTiBo 542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* **168**, 1291-1301.
13. Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue

- culture. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
14. Yamashita, Y., T. Kinoshita, S. M. Rahman, K. Okada, T. Anai and Y. Takagi (1998). Genetic analysis of restriction fragment length polymorphism on the fatty acid synthesis in soybean mutants and their progenies : I .Low linolenic acid mutants with a microsomal  $\omega$ -3 fatty acid desaturase cDNA as a probe. *Bull. Fac. Agr., Saga Univ.* **83**, 31-36.
  15. Kirby, K. S. (1968). Isolation of nucleic acids with phenolic solvents. *Meth. Enzymol.* **12 B**, 87.
  16. Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, M. Bevan (1987). GUS fusions :  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, : 3901-3907.
  17. Odell, J. T., F. Nagy and N-H. Chua (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-812.
  18. Christensen, A. H., R. A. Sharrock and P. H. Quail (1992). Maize polyubiquitin genes, structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* **18**, 675-689.
  19. An, G., M. Costa, A. Mitra, S-B Ha and L. Marton (1988). Organ-specific and developmental regulation of the nopaline synthase promoter in transgenic tobacco plant. *Plant Physiol.* **88**, 547-552.
  20. Rogers, S. G., K. O'Connel, R. B. Horsch and R. T. Fraley (1985). Investigation of factors involved in foreign protein expression in transformed plants, In "Biotechnology in Plant Science". *Academic Press Inc.* 219-226.
  21. Nagy, F., J. T. Odell, G. Morelli and N-H. Chua (1985). Properties of expression of the 35S promotor from CaMV in transgenic tobacco plants, In "Biotechnology in Plant Science". *Academic Press Inc.* 227-235.
  22. Al-Kaff, N. S., M. M. Kreike, S. N. Covey, R. Pitcher, A. M. Page and P. J. Dale (2000). Plant rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 995-999.